

**PCT**WELTOORGANISAT  
INTINTERNATIONALE ANMELDUNG VER  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : <b>G01N 33/543, 33/553, C12Q 1/68, C12N 11/00, A61K 9/50, B03C 1/00</b>		A	WO 9603653A1
			Veröffentlichungsdatum: 8. Februar 1996 (08.02.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE95/01028		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 27. Juli 1995 (27.07.95)			
(30) Prioritätsdaten: P 44 278 21.7 27. Juli 1994 (27.07.94)		DE	Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): SILICA GEL GES. MBH [DE/DE]; Ahornallee 36, D-14050 Berlin (DE).			
(71)/(72) Anmelder und Erfinder: PILGRIMM, Herbert [DE/DE]; Sophie-Charlotte-Strasse 27a, D-14169 Berlin (DE).			
(74) Anwalt: WALTER, Wolf-Jürgen; Normannenstrasse 1-2, D-10367 Berlin (DE).			

**(54) Title:** SUPERPARAMAGNETIC PARTICLES, PROCESS FOR THEIR PRODUCTION AND THEIR USE**(54) Bezeichnung:** SUPERPARAMAGNETISCHE TEILCHEN, VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG UND DEREN VERWENDUNG**(57) Abstract**

Superparamagnetic particles consist of superparamagnetic one-domain particles and aggregates of superparamagnetic one-domain particles to whose surfaces are bound organic substances optionally having further binding sites for coupling to tissue-specific binding substances, diagnostic or pharmacologically active substances. The superparamagnetic particles consist of a mixture of small superparamagnetic one-domain particles with a particle size from 3 to 50 nanometers and stable, degradable aggregates of small superparamagnetic one-domain particles with a particle size from 10 to 1000 nanometers. They are made of iron hydroxide, iron oxide hydrate, iron oxides, iron mixed oxides or iron to the surface of which are bound mono- and/or polyhydroxylic group-containing aromatic substances, polyglycerines, amino-acid-containing substances, silicate group-containing substances among the orthosilicic acids and their condensation products and phosphate group-containing substances among the ortho- or metaphosphoric acids and their condensation products. Said substances may have further binding sites. These new particles may be used to destroy tumours, increase immunity, in magnetic drug targeting, for cell fusion, gene transfers, as contrasting agents, for *in vitro* diagnosis, as magnetic ion exchangers and magnetic adsorbents, if required by exposure to magnetic fields.

**(57) Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft superparamagnetische Teilchen, die aus superparamagnetischen Eindomänenpartikeln und Aggregaten von superparamagnetischen Eindomänenpartikeln bestehen und die auf ihrer Oberfläche organische Substanzen gebunden haben, die gegebenenfalls weitere Bindungsstellen zur Kopplung von gewebespezifischen Bindungssubstanzen, diagnostischen oder pharmakologisch wirksamen Substanzen besitzen. Die superparamagnetischen Teilchen setzen sich aus einem Gemisch von kleinen superparamagnetischen Eindomänenpartikeln mit einer Teilchengröße im Bereich zwischen 3 und 50 Nanometer und stabilen, abbaubaren Aggregaten aus kleinen superparamagnetischen Eindomänenpartikeln mit einer Teilchengröße im Bereich zwischen 10 und 1000 Nanometer zusammen und bestehen aus Eisenhydroxid, Eisenoxidhydrat, Eisenmischoxid oder Eisen, die auf ihrer Oberfläche mono- und/oder polyhydroxygruppenhaltige aromatische Substanzen, Polyglycerine, aminosäurenhaltige Substanzen, silikatgruppenhaltige Substanzen der Orthokieselsäure und deren Kondensationsprodukte und phosphatgruppenhaltige Substanzen der Ortho- oder Metaphosphorsäure und deren Kondensationsprodukte gebunden tragen, die weitere Bindungsstellen aufweisen können. Die neuen Teilchen können zur Tumorschädigung, Immunsteigerung, zum magnetischen drug targeting, zur Zellfusion, zum Gentransfer, als Kontrastmittel, zur *in vitro* Diagnostik sowie als magnetische Ionenaustauscher und magnetische Adsorbenzien, gegebenenfalls unter Einwirkung von Magnetfeldern, eingesetzt werden.

#### ***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

**Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.**

AT	Oesterreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LJ	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika :
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

## Superparamagnetische Teilchen, Verfahren zur Herstellung und deren Verwendung

### Beschreibung:

Die Erfindung betrifft superparamagnetische Teilchen, die aus superparamagnetischen Eindomänenteilchen und Aggregaten von superparamagnetischen Eindomänenteilchen aus Eisenoxiden, Eisenmischoxiden oder Eisen bestehen und die auf ihrer Oberfläche organische Substanzen gebunden haben, die gegebenenfalls weitere Bindungsstellen zur Kopplung von gewebespezifischen Bindungssubstanzen, diagnostischen oder pharmakologisch wirksamen Substanzen besitzen.

Im Patent EP-B-0284549 werden superparamagnetische Eindomänenteilchen aus Eisenoxid-, Eisenmischoxid- oder Eisen mit einer Teilchengröße im Bereich zwischen 3 und 20 Nanometer beschrieben, die auf ihrer Oberfläche organische Substanzen der Gruppe der phosphat-, diphosphat-, polyphosphat-, thiophosphat-, phosphonat- oder thiophosphonatgruppenhaltige Polyalkylenglykole, phosphatgruppenhaltige Nucleotide, deren Oligomere oder deren Polymere sowie phosphatgruppenhaltige Kohlehydrate chemisch gebunden tragen, die weitere Bindungsstellen haben können.

In der DE-A-4309333 werden stabile, abbaubare Aggregate mit einer Teilchengröße im Bereich zwischen 10 und 1000 Nanometer mit definiertem Verhalten im Magnetfeld beschrieben, wobei die Aggregate aus mehreren kleinen superparamagnetischen Eindomänenteilchen aus Eisenoxid-, Eisenmischoxid- oder Eisen mit einer Teilchengröße im Bereich zwischen 3 und 20 Nanometer bestehen, die auf ihrer Oberfläche Substanzen der Gruppe der phosphat-, diphosphat-, polyphosphat-, thiophosphat-, phosphonat- oder thiophosphonatgruppenhaltigen Polyalkylenglykole, Kohlehydrate oder der phosphatgruppenhaltigen Nucleotide, deren Oligomere oder deren Polymere chemisch gebunden tragen.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, den Bereich der Substanzen, die an der Oberfläche der Eindomänenteilchen gebunden sein können, zu erweitern, um die physiko-chemischen und physiologischen Eigenschaften der entstehenden Magnetteilchen den jeweiligen

Anwendungsgebieten optimal anpassen zu können, wobei diese Substanzen stabil und leicht herstellbar sein sollen.

Überraschend wurde gefunden, daß mono- und polyhydroxylgruppenhaltige aromatische Substanzen, Polyglycerine und deren phosphat-, diphosphat-, polyphosphat-, thiophosphat-, phosphonat-, thiophosphonat-, carboxylat-, sulfat-, mercapto- oder silantriolgruppenhaltige Derivate, aminosäurenhaltigen Oligopeptide, Polypeptide, Proteine, Proteide sowie deren Derivate und Denaturierungsprodukte, mercapto- und aminogruppenhaltige Substanzen, wie Biotin, Mercaptoperin, -cytosin, -guanin, -uracil, -thymin, -hypoxanthin, sowie deren Mercapto-nucleoside und Mercapto-desoxynucleoside, Orthokieselsäure und deren Kondensationsprodukte mit zwei und mehrwertigen anorganischen Ionen und/oder organischen Säuren und Basen und Ortho- oder Metaphosphorsäure und deren Kondensationsprodukte mit der Oberfläche der superparamagnetische Teilchen stabile Bindungen eingehen, die zu stabilen magnetischen Flüssigkeiten und aggregationsstabilen, superparamagnetischen Aggregate führen.

Erfnungsgemäß erfolgt die Stabilisierung der Magnetteilchen durch eine Bindung von mono- und polyhydroxylgruppenhaltigen aromatischen Substanzen, wie z.B. Benzenoiden, Cumarienen, Lignanen, Terphenylen, Flavonoiden, Tanninen, Xanthonen, Benzophenonen, Naphthalenen, Naphthochinonen, Anthrachinonen, Anthracyclinen, polycyclischen kondensierten aromatischen Verbindungen und deren phosphat-, diphosphat-, polyphosphat-, thiophosphat-, phosphonat-, thiophosphonat-, carboxylat-, sulfat-, mercapto- oder silantriolgruppenhaltigen Derivaten, von polyhydroxylgruppenhaltigen Substanzen, ausgewählt unter Polyglycerinen und deren phosphat-, diphosphat-, polyphosphat-, thiophosphat-, phosphonat-, thiophosphonat-, carboxylat-, sulfat-, mercapto- oder silantriolgruppenhaltigen Derivaten, von aminosäurenhaltigen Substanzen, wie z.B. Oligopeptiden, Polypeptiden, Proteinen, Proteiden sowie deren Derivate und Denaturierungsprodukte, von mercapto- und aminogruppenhaltigen Substanzen, wie z.B. Biotin, Mercaptoperin, -cytosin, -guanin, -uracil, -thymin, -hypoxanthin, sowie deren Mercapto-nucleoside und Mercapto-desoxynucleoside, von silikatgruppenhaltigen Substanzen der Orthokieselsäure und deren Kondensationsprodukten mit zwei und mehrwertigen anorganischen Ionen und/oder organischen Säuren und Basen, von phosphatgruppenhaltigen

Substanzen der Ortho- oder Metaphosphorsäure und deren Kondensationsprodukte, auf der Oberfläche der Magnetteilchen.

Neben diesen Stabilisatorsubstanzen können auf der Oberfläche der Magnetteilchen noch zusätzliche organische Substanzen gebunden werden, um die Eigenschaften der Magnetteilchen den gewünschten Anforderungen besser anpassen zu können. Dazu zählen organische Substanzen der Gruppe der phosphat-, diphosphat-, carboxylat-, polyphosphat-, thiophosphat-, phosphonat-, thiophosphonat-, sulfat-, sulfonat-, mercapto-, carboxylat-, silantriolgruppenhaltigen Polyalkylenglykole, und Kohlehydrate, der phosphatgruppenhaltigen Nucleotide, deren Oligomere oder deren Polymere, der Alkyl-, Aryl-, und/oder Alkyl-aryl-polyethylenglykol-phosphate oder -phosphonate, der Gruppe der stickstoffhaltigen Polysaccharide, ausgewählt unter Mucopolysacchariden, Glykoproteiden, Chitinen, sowie deren Derivaten und Denaturierungsprodukten.

Beispielhafte Stabilisatorsubstanzen für mono- und/oder polyhydroxylgruppenhaltige aromatische Substanzen sind Caffeesäure, Gallussäure, Hexahydroxydiphenosäure, Ellagsäure, Chebulinsäure, und deren Derivate und Kondensationsprodukte mit Kohlenhydraten und Phenolkarbonsäuren, Aesculin, Rutin, Aescin, Troxerutin, Hesperidin, Aloin, Kaempferol, Quercetin, Gallotannine, Ellagittannine, Ruberythrinsäure, Carminsäure, natürliche und synthetische Farbstoffe wie Anthrachinon- oder Phthalocyaninfarbstoffe, Daunorubicin, Ansamycin sowie deren phosphat-, diphosphat-, polyphosphat-, thiophosphat-, phosphonat-, thiophosphonat-, carboxylat-, sulfat-, mercapto- oder silantriolgruppenhaltigen Derivate.

Beispielhafte Stabilisatorsubstanzen für polyhydroxylgruppenhaltige Substanzen sind Polyglycerine und deren phosphat-, diphosphat-, polyphosphat-, thiophosphat-, phosphonat-, thiophosphonat-, carboxylat-, sulfat-, mercapto- oder silantriolgruppenhaltige Derivate.

Beispielhafte Stabilisatorsubstanzen für aminosäurenhaltige Substanzen der Gruppe der Oligopeptide, Polypeptide, Proteine, Proteide sowie deren Denaturierungsprodukte, sind Protamine, Gluteline, Albumine, Globuline, Gelatine, Casein-Hydrolysate.

Beispielhafte Stabilisatorsubstanzen für mercapto- und aminogruppenhaltige Substanzen, sind Biotin, Cystein, Methionin, Glutathion, Mercaptopurin, -cytosin, -guanin, -uracil, -thymin, -hypoxanthin, sowie deren Mercapto-nucleoside und Mercapto-des-

oxynucleoside.

Beispielhafte Stabilisatorsubstanzen für silikatgruppenhaltige Kondensationsprodukte der Orthokieselsäure mit zwei und mehrwertigen anorganischen Ionen sind die Kondensationsprodukte mit den Elementen Al, Au, Bi, Cr, J, Mo, P, Pt, Se, Tc, Ti, Y, Zr und seltenen Erdmetalle.

Beispielhafte Stabilisatorsubstanzen für silikatgruppenhaltige Kondensationsprodukte der Orthokieselsäure mit organischen Säuren und Basen sind deren Kondensationsprodukte mit Phytinsäure, Algin-säure, Gallussäure.

Beispielhafte Stabilisatorsubstanzen für phosphatgruppenhaltige Kondensationsprodukte der Ortho- oder Metaphosphorsäure sind Pyrophosphorsäure, Polyphosphorsäuren, Cyclophosphate und Heterokondensationsprodukte und wasserunlösliche Salzverbindungen mit anorganischen Ionen, wie Ag, Au, Bi, Mo, Pt, Tc, Y, Zr, und basische Gruppen enthaltende organische Verbindungen, wie Spermin, Spermidin, Polyethylenimin, Oxygelatine.

Die Stabilisatorsubstanzen sind nach dem Stand der Technik herstellbar oder können käuflich erworben werden.

Erfindungsgemäß können an die Stabilisatormoleküle, die mit ihren hydroxylgruppenhaltigen aromatischen Substanzen, polyhydroxylgruppenhaltigen Polyglycerinen, aminosäurenhaltige Substanzen, silikatgruppenhaltigen Substanzen und phosphatgruppenhaltige Substanzen an der superparamagnetischen Teilchenoberfläche gebunden sind, gewebespezifische Bindungssubstanzen, wie z.B. Antigene, Antikörper, Ribonucleinsäuren, Desoxyribonucleinsäuren, Ribonucleinsäuresequenzen, Desoxyribonucleinsäuresequenzen, Haptene, Avidin, Streptavidin, Protein A, Protein G, Endotoxin-bindende Proteine, Lectine, Selectine, pharmakologisch wirksame Substanzen, wie z.B. Antitumorproteine, Enzyme, Antitumorenzyme, Antibiotika, Pflanzenalkaloide, Alkylierungsreagenzien, Antimetaboliten, Hormone und Hormonantagonisten, Interleukine, Interferone, Wachstumsfaktoren, Tumornekrosefaktoren, Endotoxine, Lymphotoxine, Urokinase, Streptokinase, Plasminogen-Streptokinase-Aktivator-Komplex, Gewebe-Plasminogen-Aktivatoren, Desmodus-Plasminogen-Aktivatoren, Makrophagen-Aktivierungs-körper, Antisera, Protease-inhibitoren, radioaktive Isotope enthaltende Substanzen, Tenside, kardiovaskulare Pharmazeutika, Chemotherapeutika, gastrointestinale Pharmazeutika, Neuropharmazeutika, pharmakologisch wirksame

Zellen, wie z.B. Organellen, Viren, Mikroben, Algen, Pilze, insbesondere Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten, Langerhans'sche Inseln, pharmakologisch wirksame Komplexbildner, wie z.B. Polycarbonsäuren, Polyaminocarboxylsäuren, Porphyrine, Katecholamine, zellfusionvermittelnde Substanzen, wie z.B. Polyethylenglykole, Alkyl-polyethylenglykole, Alkyl-aryl-polyethylenglykole, mit Wasser mischbare Polypropylenglykole (PPG)<sub>m</sub> oder mit Wasser mischbare Block-Copolymerisate aus Polyethylenglykol (PEG) und Polypropylenglykol (PPG), ausgewählt unter den Block-Copolymerisaten (PEG)<sub>n</sub>-(PEG)<sub>m</sub>, (PEG)<sub>n</sub>-(PPG)<sub>m</sub>-(PEG)<sub>n</sub>, (PPG)<sub>m</sub>-(PEG)<sub>n</sub>-(PPG)<sub>m</sub>, wobei n und m positive ganze Zahlen sind, ausgewählt für PEG im Bereich von 4 bis 1000, für PPG im Bereich von 3 bis 12 und für PEG-PPG-Block-Copolymerisate im Bereich von 3 bis 140, und/oder gentransfer-vermittelnden Substanzen, wie z.B. Polyethylenglykole und deren Derivate und Polyalkylenimine, wie z.B. Pentaethylenhexamin, Polyethylenimin, Spermin, Spermidin gebunden werden.

Die erfindungsgemäßen, mit hydroxylgruppenhaltigen aromatischen Stabilisatorsubstanzen stabilisierten superparamagnetischen Teilchen adsorbieren relativ fest aminosäurehaltige und aromatische Verbindungen, so daß für einige Anwendungsfälle eine reine adsorptive Bindung von gewebespezifische Bindungssubstanzen, pharmakologisch wirksame Substanzen und pharmakologisch wirksame Zellen ausreichend ist, um sie für ein magnetischen drug targeting oder als Kontrastmittel einsetzen zu können.

Die erfindungsgemäßen, mit Polyglycerinen und deren Derivaten stabilisierten superparamagnetischen Teilchen sind für viele Kopp lungsreaktionen verwendbar, bei denen die Reaktivität der phosphat-, diphosphat-, polyphosphat-, thiophosphat-, phosphonat-, thiophosphonat-, carboxylat-, sulfat-, mercapto- oder silantriolgruppenhaltigen Derivate für eine Bindung von gewebespezifischen Bindungssubstanzen, pharmakologisch wirksamen Substanzen, pharmakologisch wirksamen Zellen, pharmakologisch wirksamen Komplexbildnern, zellfusionvermittelnder Substanz und/oder gentransfer-vermittelnder Substanz anwendbar ist.

Die erfindungsgemäßen, mit aminosäuregruppenhaltigen Stabilisatorsubstanzen stabilisierten superparamagnetischen Teilchen sind für viele Kopplungsreaktionen verwendbar, bei denen die Reaktivität

der Aminosäuregruppen für eine chemische Bindung von gewebespezifischen Bindungssubstanzen, pharmakologisch wirksamen Substanzen, pharmakologisch wirksamen Zellen, pharmakologisch wirksamen Komplexbildnern, zellfusionvermittelnder Substanz und/oder gentransfer-vermittelnder Substanz anwendbar ist.

Die erfindungsgemäßen, mit silikatgruppenhaltigen Substanzen der Orthokieselsäure und deren Kondensationsprodukten mit organischen Säuren und Basen, stabilisierten superparamagnetischen Teilchen sind für adsorptive Bindungen und für viele Kopplungsreaktionen verwendbar, bei denen die Reaktivität der funktionellen Gruppen der organischen Säuren und Basen, die mit den silikatgruppen stabile Kondensationsprodukte gebildet haben, für eine chemische Bindung von gewebespezifische Bindungssubstanzen, pharmakologisch wirksame Substanzen, pharmakologisch wirksame Zellen, pharmakologisch wirksamen Komplexbildner, zellfusionvermittelnden Substanz und/oder gentransfer-vermittelnden Substanz anwendbar ist.

Die Kopplung gewebespezifischer Bindungssubstanzen, pharmakologisch wirksamer Substanzen, pharmakologisch wirksamer Zellen, pharmakologisch wirksamer Komplexbildner, zellfusionvermittelnder Substanzen oder gentransfer-vermittelnder Substanzen an die superparamagnetischen Teilchen hat weiterhin den Vorteil, daß über die Relaxationszeitveränderungen der resonanzfähigen Wasserstoffatome im Körper der Therapiefortschritt mit der Kernspin-Diagnostik beobachtet werden kann.

Die Herstellung der superparamagnetischen Teilchen erfolgt durch eine Fällung aus einer Eisensalzlösung mit Alkalilauge oder Ammoniakwasser und einer nachfolgenden gezielten Agglomeration der entstandenen superparamagnetischen Eindomänenteilchen. Dabei werden die superparamagnetischen Eindomänenteilchen in Wasser verführt und bei einem pH-Wert von 1 bis 7 durch Erhitzen auf 80 bis 120°C, bei Temperaturen über 100°C im Autoklaven, zur Aggregation gebracht.

Nach dem Abkühlen der Dispersion werden die Teilchen so lange gewaschen, bis die elektrische Leitfähigkeit des Filtrates  $< 10 \mu\text{S}/\text{cm}$  beträgt. Die so hergestellten superparamagnetischen Teilchen bilden sofort einen schnell sedimentierenden Niederschlag, der sich auch durch starkes Rühren oder durch Ultraschallbehandlung nicht in eine stabile Dispersion überführen lässt. Erst die Bindung von Stabilisatorsubstanzen auf der Oberfläche der superparamagnetischen Teilchen sorgt für eine Dispergierbarkeit.

Bei einigen Stabilisatorsubstanzen reicht Röhren mit dem Glasstab, bei anderen Stabilisatorsubstanzen benötigt man einen stärkeren Energieeintrag, wie z.B. Erwärmung oder Einwirkung von Ultraschall, um stabile Dispersionen zu erhalten.

Je nach Anwendungsgebiet können die magnetischen Dispersionen dialysiert werden, um den überschüssigen Anteil an Stabilisatorsubstanz zu entfernen.

Die stabilisierten superparamagnetischen Teilchendispersionen enthalten die noch nicht oder nur schwach aggregierten superparamagnetischen Eindomänenteilchen. Diese bilden eine stabile magnetische Flüssigkeit, die sich leicht von den größeren superparamagnetischen Teilchen durch deren Sedimentation in einem Magnetfeld entsprechender Stärke und Inhomogenität abtrennen lassen. Die stabilisierten superparamagnetischen Eindomänenteilchen lassen sich gut als Kontrastmittel für die Kernspin-Diagnostik, als zellfusionvermittelnde Substanzen oder als gentransfer-vermittelnde Substanzen verwenden, wobei auch hier die Wirksamkeit der Zellfusion und des Gentransfers mit der Kernspin-Diagnostik untersucht werden kann.

In einer einfachen Ausführung der magnetischen Separation stellt man ein Becherglas mit der magnetischen Dispersion auf einen Permanentmagneten mit einer magnetischen Flußdichte von 0,1 T und gießt nach einer Sedimentationszeit von ca. 30 min die überstehende magnetische Flüssigkeit ab. Zurück bleiben die superparamagnetischen Aggregate, die, je nach Teilchengröße, sich wieder spontan in der Dispersion verteilen oder als Bodensatz im Becherglas zurückbleiben. Bis zu Teilchengrößen von ungefähr 500 nm verteilen sich die superparamagnetischen Teilchen wieder spontan oder unter leichtem Röhren im wäßrigen Dispersionsmittel.

Die Sedimentationsstabilität der erfindungsgemäßen superparamagnetischen Aggregate ist wesentlich höher als bei den bisher bekannten Magnetteilchen mit vergleichbaren magnetischen Eigenschaften, was wahrscheinlich auf die starke Strukturierung der die superparamagnetischen Teilchen umgebenden Wassermoleküle und den damit vergrößerten Stokes'schen Teilchendurchmesser zurückzuführen ist.

Da der Anteil an superparamagnetischen Eindomänenteilchen in den superparamagnetischen Aggregaten wesentlich höher als bei den bisher bekannten Magnetteilchen ist, ist auch die Abscheidungsgeschwindigkeit der superparamagnetischen Aggregate in einem inhomogenen

genen Magnetfeld größer. In einer 10 Gew.-% igen wäßrigen Dispersion von superparamagnetischen Teilchen, mit einem Durchmesser von ca 100 nm und einem Magnetitanteil von 95 %, beträgt die Abscheidungszeit der Magnetteilchen auf einen Permanentmagneten mit einer magnetischen Flußdichte von 0,1 T weniger als 1 min.

Die erfindungsgemäßen superparamagnetischen Teilchen als Aggregate haben Eisenoxidegehalte von 90 bis 98 Gew.-%. Gegenüber dem Stand der Technik, daß Magnetteilchen bis zu 60 Gew.-% Eisenoxid enthalten können, bedeutet das eine wesentliche Verbesserung der magnetischen Eigenschaften. Damit können die neuen superparamagnetischen Teilchen, bei gleicher magnetischen Wechselwirkung, entsprechend kleiner als die bisher bekannten Magnetteilchen sein. Die spezifische Oberfläche vergrößert sich, es können mehr pharmakologisch wirksame Substanzen oder gewebespezifische Bindungssubstanzen auf der Oberfläche gekoppelt werden. Mit Verkleinerung der Teilchengröße wird auch die biologische Verträglichkeit besser, die Abbaugeschwindigkeit im Körper erhöht. Auch die freie verfügbare Zeit der Magnetteilchen beim magnetischen drug targeting, d.h. die Zeit bis die Teilchen vom retikuloendothelialen System gebunden sind, erhöht sich mit Verringerung der Teilchengröße. Die Bioverfügbarkeit der superparamagnetischen Teilchen im Körper beträgt, je nach Teilchengröße und Zusammensetzung der Stabilisatorsubstanzen nur wenige Minuten bis einige Stunden d.h. das retikuloendothiale System bindet die superparamagnetischen Teilchen relativ schnell.

An Beispielen sollen die Herstellung der erfindungsgemäßen superparamagnetischen Teilchen erläutert werden

**Beispiel 1:**

Eisen (III)-chlorid (270 g) und Eisen(II)-sulfat (153 g) werden in 1 l dest. Wasser gelöst. Durch Zugabe von Natronlauge wird unter Röhren ein pH-Wert von 9,5 eingestellt. Nach erfolgter Fällung wird die Dispersion unter Röhren mit Salzsäure auf den pH-Wert von 5,0 eingestellt und auf 100°C erwärmt. Nach dem Abkühlen der Dispersion wird der Niederschlag gewaschen, bis das Filtrat eine elektrische Leitfähigkeit von < 10 µS/cm besitzt. Die Stabilisierung der superparamagnetischen Teilchen erfolgt durch Mischen einer wäßrigen oder niedrigsiedende polare Lösungsmittel enthaltenden Stabilisatorlösung mit den Magnetteilchen bei Raumtemperatur.

tur. Die Stabilisatorlösung kann dabei, je nach den gewünschten Eigenschaften, aus reinen Stabilisatorsubstanzen oder aus Mischungen von Stabilisatorsubstanzen bestehen. Zur Beschleunigung der Dispergierung und Stabilisierung kann die Dispersion gerührt oder mit Ultraschall behandelt werden. Kommen niedrigsiedende organische Lösungsmittel zur Anwendung, werden diese zur Entfernung nach der Stabilisierung durch Vakuumverdampfung oder Dialyse entfernt.

**Beispiel 2:**

Eisen(III)-chlorid (270 g) und Eisen(II)-chlorid(119 g) werden in 1 l dest. Wasser gelöst. Durch Zugabe von Ammoniakwasser wird unter Rühren der pH-Wert der Lösung auf 9,6 eingestellt. Nach erfolgter Fällung wird die Dispersion mit Salzsäure auf den pH 6,0 eingestellt, mit 20 ml 30%-igem Wasserstoffperoxid versetzt und auf 100°C erwärmt. Nach dem Abkühlen wird der Niederschlag mit dest. Wasser gewaschen, bis das Filtrat eine elektrische Leitfähigkeit von < 10  $\mu$ S/cm besitzt. Das entstehende  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> kann stabilisiert werden.

**Beispiel 3:**

Eisen (III)-chlorid (270 g) und Eisen(II)-sulfat (153 g) werden in 1 l dest. Wasser gelöst. Durch Zugabe von Natronlauge wird unter Rühren ein pH-Wert von 9,5 eingestellt. Nach erfolgter Fällung wird die Dispersion unter Rühren mit 20g Polyphosphorsäure versetzt und auf 100°C erwärmt. Nach dem Abkühlen der Dispersion wird der Niederschlag gewaschen, bis das Filtrat eine elektrische Leitfähigkeit von < 10  $\mu$ S/cm besitzt. Der Feststoff wird in 300 ml Wasser verrührt und 20 min mit Ultraschall von 100 W Leistung dispergiert. Die entstehende Dispersion wird 30 min auf einen Permanentmagneten mit einer magnetischen Flussdichte von 0,1 T sedimentiert und der Überstand von magnetischer Flüssigkeit abgegossen. Der Überstand enthält überwiegend stabilisierte superparamagnetische Eindomänenteilchen. Das Sediment auf dem Permanentmagneten enthält die superparamagnetischen abbaubaren Aggregate. Durch mehrmaliges Waschen mit dest. Wasser und erneuter Sedimentation im Magnetfeld können die superparamagnetischen Aggregate rein und in enger Teilchengrößenverteilung erhalten werden. Die superparamagnetischen Teilchen haben einen mittleren Teilchendurchmesser von ca.80 nm.

**Beispiel 4:**

Die gesamte Menge des Überstandes von mit Polyphosphorsäure stabilisierten superparamagnetischen Eindomänenteilchen von Beispiel 3 wird in einer Lösung von 20 g Oxy-polygelatine in 400 ml physiologischer Kochsalzlösung verrührt. Die entstehende magnetische Flüssigkeit kann als i.v. Kontrastmittel für die Kernspin-Diagnostik eingesetzt werden.

**Beispiel 5:**

Die gesamte Menge des mit Polyphosphorsäure stabilisierten und gewaschenen Magnetit-Niederschlages von Beispiel 3 wird unter Rühren in 300 ml Wasser verrührt, mit 10 %-iger Salzsäure auf pH 1,0 eingestellt, eine Mischung von 28,4 g Bismuthchlorid in 20 ml konz. Salzsäure dazugegeben und anschließend mit Natronlauge der pH von 2,5 eingestellt. In diese Dispersion wird eine Lösung von 30 g Natriumsilikat in 200 ml dest. Wasser verrührt und 10 min mit Ultraschall von 100 W Leistung dispergiert. Die Abtrennung der nicht oder nur schwach agglomerierten superparamagnetischen Eindomänenteilchen, die eine stabile magnetische Flüssigkeit bilden, erfolgt durch eine magnetische Sedimentation wie im Beispiel 3 beschrieben. Die superparamagnetischen Eindomänenteilchen und die superparamagnetischen Aggregate sind sehr gut als orales Kontrastmittel für die Kernspin- und Röntgen-Diagnostik anwendbar.

**Beispiel 6:**

Die gesamte Menge des Magnetit-Niederschlages von Beispiel 1 wird zur Stabilisierung in eine Lösung von 30 g Gallussäure in 400 ml dest. Wasser verrührt und 10 min mit Ultraschall von 100 W Leistung dispergiert. Die Abtrennung der nicht oder nur schwach agglomerierten superparamagnetischen Eindomänenteilchen, die eine stabile magnetische Flüssigkeit bilden, erfolgt durch eine magnetische Sedimentation wie im Beispiel 3 beschrieben. Die superparamagnetischen Aggregate sind sehr gut für die magnetische Anreicherung in Tumoren geeignet. Hier können sie durch magnetomechanische Immunstimulierung, oder zusätzlich durch Hyperthermie, d.h. durch Einstrahlung elektromagnetischer Strahlung und Erwärmung des Tumors, den Tumor zerstören. Die superparamagnetischen Eindomänenteilchen sind als orales oder i.v. Kontrastmittel für die Kernspin-Diagnostik anwendbar.

**Beispiel 7:**

Die gesamte Menge des Magnetit-Niederschlages von Beispiel 1 wird in eine Lösung von 40g Methoxy-polyethylenglykol-phosphat (MG 2000) und 20 g Rutinosid in 300 ml Methanol gegeben und 5 min mit Ultraschall von 100 W Leistung dispergiert. Anschließend wird zur Dispersion 500 ml dest. Wasser gegeben und das Methanol abdestilliert. Die wässrige Dispersion wird nochmals 20 min mit Ultraschall von 100 W Leistung dispergiert. Die Abtrennung der nicht oder nur schwach agglomerierten superparamagnetischen Eindomänenteilchen, die eine stabile magnetische Flüssigkeit bilden, erfolgt durch eine magnetische Sedimentation wie im Beispiel 3 beschrieben. Die superparamagnetischen Aggregate sind für eine parenterale Tumorschädigung einsetzbar, da sich, wie in Versuchen mit Nacktmäusen und Ratten gezeigt hat, eine starke Aktivierung des Immunsystems einsetzt, die zur totalen Remission von Tumoren führen kann. Des weiteren sind die superparamagnetischen Aggregate für eine Kopplung von aminosäurehaltigen gewebespezifischen Bindungssubstanzen, pharmakologisch wirksamen Substanzen und pharmakologisch wirksamen Zellen geeignet. Die superparamagnetischen Eindomänenteilchen sind als parenterales Kontrastmittel für die Kernspin-Diagnostik zur Darstellung des Gefäßsystems und des Magen-Darm-Traktes oder als Vektor für den Gentransfer anwendbar.

**Beispiel 8:**

20 ml der Dispersion der superparamagnetischen Aggregate von Beispiel 7, mit einer magnetischen Sättigungsinduktion von 10 mT, werden mit einer Lösung von 10 mg Doxorubicin in 10 ml physiologische Kochsalzlösung gemischt. Diese superparamagnetischen Teilchen sind sehr gut für die magnetische Anreicherung in Tumoren geeignet. Die starke Aktivierung des Immunsystems durch die superparamagnetischen Teilchen kann zu einer Tumorschädigung führen, die durch die Wirkung des Zytostatikum verstärkt werden kann.

**Beispiel 9:**

Die gesamte Menge des  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Niederschlages von Beispiel 2 wird in eine Lösung von 30 g Tanninsäure in 500 ml Wasser gegeben und 5 min gerührt und 10 min mit einem Ultraschalldispersator (100 W Leistung) dispergiert. Die entstehende Dispersion wird mit einem 50 kD-Filter gegen dest. Wasser dialysiert, um überschüssige Stabilisatorsubstanzen zu entfernen. Die Abtrennung der nicht oder nur schwach agglomerierten superparamagnetischen Eindomänenteilchen, die eine stabile magnetische Flüssigkeit bilden, erfolgt

durch eine magnetische Sedimentation wie im Beispiel 3 beschrieben. Die entstehenden superparamagnetischen Aggregate haben einen mittleren Teilchendurchmesser von ca. 80 nm und sind für die Kopplung von aminosäurehaltigen gewebespezifischen Bindungssubstanzen, pharmakologisch wirksamen Substanzen und pharmakologisch wirksamen Zellen geeignet. Die superparamagnetischen Eindomänenteilchen sind als orales oder i.v. Kontrastmittel für die Kernspin-Diagnostik anwendbar.

Beispiel 10:

20 ml der superparamagnetischen Aggregate von Beispiel 9, mit einer magnetischen Sättigungsinduktion von 10 mT, werden mit einer Lösung von 10 mg Mitoxantron in 20 ml einer acetatgepufferten physiologische Kochsalzlösung gemischt.

Diese superparamagnetischen Teilchen sind sehr gut für die magnetische Anreicherung in Tumoren geeignet. Hier können sie durch die magnetische Anreicherung im Tumor und die verstärkte Desorption des Zytostatikums unter der Wirkung des inhomogenen Magnetfeldes zur Tumorschädigung führen.

Beispiel 11:

Die gesamte Menge des Magnetit-Niederschlages von Beispiel 1 wird in eine Lösung von 20 g Oxy-polygelatine in 400 ml dest. Wasser gegeben, 5 min gerührt und gewaschen, bis das Filtrat eine elektrische Leitfähigkeit von < 100 µS/cm besitzt. Die Suspension wird 10 min mit Ultraschall von 100 W Leistung dispergiert. Die Abtrennung der nicht oder nur schwach agglomerierten superparamagnetischen Eindomänenteilchen, die eine stabile magnetische Flüssigkeit bilden, erfolgt durch eine magnetische Sedimentation wie im Beispiel 2 beschrieben. Die superparamagnetischen Eindomänenteilchen sind als parenterales Kontrastmittel für die Kernspin-Diagnostik zur Darstellung des Gefäßsystems anwendbar.

Beispiel 12:

Die gesamte Menge des Magnetit-Niederschlages von Beispiel 2 wird in eine Lösung von 40 ml einer 40 %-igen Phytinsäurelösung in 500 ml dest. Wasser gegeben, 5 min gerührt und 10 min mit einem Ultraschalldispersator (100 W Leistung) dispergiert. Die entstehende Dispersion wird mit einer 30 %-igen Natriumsilikatlösung auf einen pH-Wert von 7,0 titriert, 10 min mit einem Ultraschalldispersator (100 W Leistung) dispergiert und 30 min auf einen Permanentmagneten mit einer magnetischen Flußdichte von 0,1 T sedimentiert.

tiert und der Überstand von magnetischer Flüssigkeit abgesaugt. Das Sediment auf dem Magnetfeld enthält die superparamagnetischen Teilchen. Durch mehrmaliges Waschen mit dest. Wasser und erneuerte Sedimentation im Magnetfeld können die superparamagnetischen Teilchen rein und in enger Teilchengrößeverteilung erhalten werden. Die superparamagnetischen Teilchen haben einen mittleren Teilchendurchmesser von 160 nm und sind für die Kopplung von aminosäurehaltigen gewebespezifischen Bindungssubstanzen, pharmakologisch wirksamen Substanzen und pharmakologisch wirksamen Zellen geeignet.

Die Hauptanwendungsgebiete der erfundungsgemäßen superparamagnetischen Teilchen liegen auf den Gebieten des magnetischen drug targeting, der Kontrastmittel, der Zellfusion und des Gentransfers. Aufgrund der sehr hohen Anteiles an Magnetmaterial (90 bis 98 Gew.-%) lassen sich schon kleine Magnetteilchen sehr gut und sehr schnell in bestimmte Regionen des Körpers mit Hilfe von elektromagnetischen oder Permanentmagnet-Feldern konzentrieren. Die erfundungsgemäßen superparamagnetischen Aggregate sind für eine parenterale Tumorschädigung einsetzbar, da bei ihrer Injektion in den Blutkreislauf eine starke Aktivierung des Immunsystems einsetzt, die zur totalen Remission von Tumoren führen kann. Bei Kopplung von pharmakologisch wirksamen Substanzen an die superparamagnetischen Aggregate, kann deren Konzentration am Wirkungsort erhöht werden, insbesondere beim Einsatz tumorspezifischer Antikörper. Dieser Umstand hat für die Krebstherapie Bedeutung, da die zur Chemotherapie von Tumoren eingesetzten Substanzen sehr starke Nebenwirkungen auf den gesamten Organismus ausüben und bei einer Anreicherung am Wirkungsort der übrige Körper weniger stark mit Zytostatika oder radioaktiven Isotopen belastet wird.

Bei Kopplung von Nucleiden, Nucleinsäuren, Antimetaboliten oder antitumoralen oder antiviralen Derivaten an die superparamagnetischen Aggregate, kann deren Konzentration am Wirkungsort drastisch erhöht werden, insbesondere bei ihrem Einsatz in der Gentherapie.

Die superparamagnetischen Teilchen können durch Kopplung an Viren, Bakterien, Zellen und deren Oberflächenmolekülen zur Immunaktivierung im Körper eingesetzt werden, wobei die Einwirkung von Magnetfeldern die Immunaktivierung unterstützt.

Die Menge der einzusetzenden superparamagnetischen Teilchen ist beim magnetischen drug targeting abhängig von der Teilchengröße, von der Zusammensetzung der Stabilisatorsubstanzen, von der Anwesenheit bindungsspezifischer Antikörper und von der magnetischen

Feldstärke am Wirkungsort. Die erfindungsgemäßen superparamagnetischen Teilchen können als orale und parenterale Kontrastmittel für die Kernspin-Diagnostik eingesetzt werden. Die Mengen an superparamagnetischen Teilchen liegen bei der Anwendung als parenterales Kontrastmittel für die MRI bei ca. 20 µM Fe/kg Körpergewicht und bei der Anwendung als orales Kontrastmittel für die MRI bei ca. 10 µM Fe/kg Körpergewicht.

In Tierversuchen konnten gute Kontrasteffekte als parenterales Kontrastmittel für Leber, Milz, Knochenmark und Blutkreislauf, für die Lymphographie, als antikörperspezifische Kontrastmittel für die Tumor- und Thrombendiagnostik und als orales Kontrastmittel für die Abbildung des Magen-Darm-Traktes gefunden werden.

Die superparamagnetischen Teilchen können auch zur in vitro Diagnostik, Zellfusion und zum Gentransfer gegebenenfalls unter Einwirkung von Magnetfeldern, verwendet werden, wenn auf der Oberfläche der Teilchen die entsprechenden diagnostischen, zellfusionvermittelnden und gentransfer-vermittelnde Substanzen gebunden werden. Aufgrund der starken magnetischen Wechselwirkung der superparamagnetischen Teilchen mit Magnetfeldern, lassen sich noch sehr kleine superparamagnetische Teilchen nach erfolgter diagnostischer Reaktion, Zellfusion oder erfolgtem Gentransfer leicht aus dem Reaktionsgemisch wieder abtrennen.

Die superparamagnetischen Teilchen können auch als magnetische Ionenaustauscher und magnetische Adsobentien zur Abtrennung von Ionen, organischen Molekülen, Makromolekülen, Zellen, Viren u.s.w. in der Biotechnologie, Abwasserreinigung oder sonstigen Stofftrennungsverfahren verwendet werden, wenn auf der Oberfläche der Teilchen die entsprechenden Ionenaustauschergruppen und Adsorben-tien gebunden werden.

**Patentansprüche**

1. Superparamagnetische Teilchen, gekennzeichnet durch,
  - (a) kleine superparamagnetische Eindomänenteilchen aus Eisenhydroxid, Eisenoxidhydrat, Eisenoxid-, Eisenmischoxid- oder Eisen mit einer Teilchengröße im Bereich zwischen 3 und 50 Nanometer und/oder
  - (b) stabile, abbaubare Aggregate mit einer Teilchengröße im Bereich zwischen 10 und 1000 Nanometer, wobei die Aggregate aus mehreren kleinen superparamagnetischen Eindomänenteilchen aus Eisenhydroxid, Eisenoxidhydrat, Eisenoxid-, Eisenmischoxid- oder Eisen mit einer Teilchengröße im Bereich zwischen 3 und 50 Nanometer bestehen, die
  - (c) auf ihrer Oberfläche Substanzen der Gruppe der
    - (i) mono- und/oder polyhydroxylgruppenhaltigen aromatischen Substanzen, ausgewählt unter Benzenoiden, Cumarienen, Lignanen, Terphenylen, Flavonoiden, Tanninen, Xanthonen, Benzophenonen, Naphthalenen, Naphthochinonen, Anthrachinonen, Anthracyclinen, polycyclischen kondensierten aromatischen Verbindungen und deren phosphat-, diphosphat-, polyphosphat-, thiophosphat-, phosphonat-, thiophosphonat-, carboxylat-, sulfat-, mercapto- oder silantriolgruppenhaltigen Derivaten, und/oder
    - (ii) polyhydroxylgruppenhaltigen Substanzen, ausgewählt unter Polyglycerinen und deren phosphat-, diphosphat-, polyphosphat-, thiophosphat-, phosphonat-, thiophosphonat-, carboxylat-, sulfat-, mercapto- oder silantriolgruppenhaltigen Derivaten, und/oder
    - (iii) aminosäurenhaltigen Substanzen, ausgewählt unter den Oligopeptiden, Polypeptiden, Proteinen, Proteiden sowie deren Derivate und Denaturierungsprodukte, mercapto- und aminogruppenhaltigen Substanzen, ausgewählt unter Biotin, Mercaptoperin, -cytosin, -guanin, -uracil, -thymin, -hypoxanthin, sowie deren Mercapto-nucleoside und Mercapto-desoxynucleoside, und/oder
    - (iv) silikatgruppenhaltigen Substanzen der Orthokieselsäure und deren Kondensationsprodukte mit zwei und mehrwertigen anorganischen Ionen und/oder organischen Säuren und Basen und/oder
    - (v) phosphatgruppenhaltigen Substanzen der Ortho- oder Metaphosphorsäure und deren Kondensationsprodukte, sowie Heterokondensati-

onsprodukte und wasserunlösliche Salzverbindungen mit anorganischen Ionen und basische Gruppen enthaltende organische Verbindungen gebunden tragen,  
und auf ihrer Oberfläche gegebenenfalls zusätzlich zu den Substanzen (c) noch organische Substanzen (d), der Gruppe der  
(vi) phosphat-, diphosphat-, carboxylat-, polyphosphat-, thiophosphat-, phosphonat-, thiophosphonat-, sulfat-, sulfonat-, mercapto-, carboxylat-, silantriol-, trialkoxysilangruppenhaltigen Polyalkylenglykole und Kohlehydrate und/oder  
(vii) phosphatgruppenhaltigen Nucleotide, deren Oligomere oder deren Polymere und/oder  
(viii) Alkyl-, Aryl-, Alkyl-aryl-polyalkylenglykolphosphate oder -phosphonate, Phosphate oder Phosphonate der Block-Copolymerisate aus Polyethylenglykol (PEG) und Polypropylenglykol (PPG), ausgewählt unter den Block-Copolymerisaten  $(PEG)_n-(PEG)_m$ ,  $(PEG)_n-(PPG)_m-(PEG)_n$ ,  $(PPG)_m-(PEG)_n-(PPG)_m$ , und/oder  
(ix) stickstoffhaltigen Polysacchariden, aufgewählt unter Mucopolysacchariden, Glykoproteiden, Chitinen, sowie deren Derivate und Denaturierungsprodukte, chemisch gebunden tragen.

2. Superparamagnetische Teilchen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Teilchengröße der superparamagnetischen Eindomänenenteilchen (a) im Bereich von 3 bis 50 nm liegt und die Teilchengröße der stabilen, abbaubaren Aggregate superparamagnetischen Teilchen (b) im Bereich von 10 bis 1000 nm.

3. Superparamagnetische Teilchen nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die superparamagnetischen Eindomänenenteilchen (a) und die Teilchen der stabilen, abbaubaren Aggregate (b) aus Eisenhydroxid, Eisenoxidhydrat,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , aus den Eisenmischoxiden der allgemeinen Formel  $m\text{MO}.\text{nFe}_2\text{O}_3$ , worin M die zweiwertigen Metallionen Fe, Co, Ni, Mn, Be, Mg, Ca, Ba, Sr, Cu, Zn, Pt oder Gemische davon bedeuten, aus den Mischoxiden der allgemeinen Formel  $m\text{Fe}_2\text{O}_3.\text{nMe}_2\text{O}_3$ , worin Me die dreiwertigen Metallionen Al, Cr, Bi, seltene Erdmetalle oder Gemische davon bedeuten, oder Eisen bestehen.

4. Superparamagnetische Teilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanzen c) ausgewählt sind unter mono- und/oder polyhydroxylgruppenhaltigen aromatischen

Benzenoiden, Cumarinen, Lignanen, Terphenylen, Flavonoiden, Tanninen, Xanthonen, Benzophenonen, Naphthalenen, Naphthochinonen, Anthrachinonen, Anthracyclinen, polycyclischen kondensierten aromatischen Verbindungen und deren phosphat-, diphosphat-, polyphosphat-, thiophosphat-, phosphonat-, thiophosphonat-, carboxylat-, sulfat-, mercapto- oder silantriolgruppenhaltigen Derivaten.

5. Superparamagnetische Teilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanzen c) ausgewählt sind unter den aminosäurenhaltigen Substanzen der Oligopeptide, Polypeptiden, Proteine, Proteide sowie deren Derivate und Denaturierungsprodukte, den mercapto- und aminogruppenhaltigen Substanzen, ausgewählt unter Biotin, Cystein, Methionin, Glutathion, Mercaptapurin, -cytosin, -guanin, -uracil, -thymin, -hypoxanthin, sowie deren Mercapto-nucleoside und Mercapto-desoxynucleoside;

6. Superparamagnetische Teilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanzen c) ausgewählt sind unter den silikatgruppenhaltigen Substanzen der Orthokieselsäure und deren Kondensationsprodukten mit zwei und mehrwertigen anorganischen Ionen, ausgewählt unter Al, Au, Bi, Cr, J, Mo, P, Pt, Se, Tc, Ti, Y, Zr, seltene Erdmetalle und/oder organischen Säuren und Basen.

7. Superparamagnetische Teilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Substanzen (c) ausgewählt sind unter den phosphatgruppenhaltigen Substanzen der Ortho- oder Metaphosphorsäure und deren Kondensationsprodukte, sowie Heterokondensationsprodukte und wasserunlösliche Salzverbindungen mit anorganischen Ionen, organischen Basen und basische Gruppen enthaltende organische Verbindungen.

8. Superparamagnetische Teilchen nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß an die superparamagnetischen Teilchen  
(i) eine gewebespezifische Bindungssubstanz aus der Gruppe der Antigene, Antikörper, Ribonucleinsäuren, Desoxyribonucleinsäuren, Ribonucleinsäuresequenzen, Desoxyribonucleinsäuresequenzen, Hapten, Avidin, Streptavidin, Protein A, Protein G, Endotoxinbindende Proteine, Lectine, Selectine gebunden ist;  
(ii) eine pharmakologisch wirksame Substanz aus der Gruppe der Antitumorproteine, Enzyme, Antitumorenzyme, Antibiotika, Pflanze-

nalkaloide, Alkylierungsreagenzien, Antimetaboliten, Hormone und Hormonantagonisten, Interleukine, Interferone, Wachstumsfaktoren, Tumornekrosefaktoren, Endotoxine, Lymphotoxine, Urokinase, Streptokinase, Plasminogen-Streptokinase-Aktivator-Komplex, Gewebe-Plasminogen-Aktivatoren, Desmodus-Plasminogen-Aktivatoren, Makrophagen-Aktivierungskörper, Antisera, Proteaseninhibitoren, radioaktive Isotope enthaltende Substanzen, Tenside, kardiovaskuläre Pharmazeutika, Chemotherapeutika, gastrointestinale Pharmazeutika, Neuropharmazeutika gebunden ist;

(iii) pharmakologisch wirksame Zellen aus der Gruppe der Organellen, Viren, Mikroben, Algen, Pilzen, insbesondere Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Monozyten, Lymphozyten, Langerhans'sche Inseln gebunden sind;

(iv) ein pharmakologisch wirksamer Komplexbildner aus der Gruppe der Polycarbonsäuren, Polyaminocarboxylsäuren, Porphyrinen, Katecholamine gebunden sind gebunden ist;

(v) zellfusionvermittelnde Substanzen aus der Gruppe der Polyalkylenglykole, Alkyl-polyalkylenglykole, Aryl-polyalkylenglykole, Alkyl-aryl-polyalkylenglykole gebunden sind;

(vi) gentransfer-vermittelnde Substanzen aus der Gruppe der Polyalkylenglykole und/oder Polyimine gebunden sind.

9. Superparamagnetische Teilchen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß auf ihrer Oberfläche zusätzlich zu den Substanzen (c) noch organische Substanzen (d) gebunden sind, ausgewählt unter  
 (i) den Verbindungen der allgemeinen Formel



worin X eine funktionelle Gruppe darstellt, ausgewählt aus der Alkoxy-, Monalkylamino-, Dialkylamino-, Trialkylamino- und Alkylthiogruppe, bei denen die Zahl der Kohlenstoffatome im Alkylteil dieser Gruppen im Bereich von 1 und 4 liegt, oder eine funktionelle Gruppe darstellt, ausgewählt unter der Hydroxyl-, Amin-, Aldehyd-, Dimethylacetal-, Diethylacetal-, Epoxy-, Thiol-, Carboxy-, 4,6-Dichlortriazin-, Hydroxamsäure-, Isocyanat-, Acylazid-, Anhydrid-, Diazoniumsalz-, Iminocarbonat- und Toluolsulfonatgruppe;

R ist ein Polyethylenglykolrest (PEG)<sub>n</sub>, ein mit Wasser mischbarer Polypropylenglykolrest (PPG)<sub>m</sub> oder ein mit Wasser mischbarer Block-Copolymerisatrest aus Polyethylenglykol (PEG) und Polypropylenglykol (PPG), ausgewählt unter den Block-Copolymerisaten

(PEG)<sub>n</sub>-(PEG)<sub>m</sub>, (PEG)<sub>n</sub>-(PPG)<sub>m</sub>-(PEG)<sub>n</sub>, (PPG)<sub>m</sub>-(PEG)<sub>n</sub>-(PPG)<sub>m</sub>,  
n und m sind positive ganze Zahlen, ausgewählt für PEG im Bereich von 4 bis 1000, für PPG im Bereich von 3 bis 12 und für PEG-PPG-Block-Copolymerisate im Bereich von 3 bis 140,

R ist ein Polyglycerinrest oder

R ist ein Kohlehydratrest, ausgewählt aus den Monosacchariden Glucose, Fructose, Ribose, Desoxyribose, Inosit, aus den Oligosacchariden Saccharose, Raffinose, Gentianose, Maleicitose, Stachyose,, Verbascose, aus den Polysacchariden Stärke, Lichenine, Glykogen, Dextrine, Cyclodextrine , Dextrane, Inuline, Fruktosane, Lävane, Mannane, Galaktane, Xylane, Arabane, Pektine, Makropolysaccharide, Glyccoproteide, aus Polyuridensäure, Polyglucuronsäre, Polygalacturonsäure, Polymannuronsäure und/oder Alginsäure und deren Derivaten;

A fehlt oder

A ist eine Alkyl-, Alkoxy-, Acyl-, Acylamin-, Alkylamingruppe, bei denen die Zahl der Kohlenstoffatome der Alkoxy-, Acyl-, Acylamin-, Alkylgruppe im Bereich von 1 bis 4 liegt;

B ist ein phosphorhaltiger Rest, ausgewählt unter Monophosphat, Diphosphat, Polyphosphat, Phosphonat, Thiophosphat, Thionaphphonat, oder ein carboxylat-, sulfat-, sulfonat-, mercapto-, silantriol-oder trialkoxysilanhaltiger Rest;

(ii) phosphatgruppenhaltigen Nucleotiden Mono-, Di-, Tri-phosphorsäureester oder Mono-, Di-, Tri-phosphorsäureesterchloriden von Adenosin, Guanosin, Cytidin, Uridin, Thymidin, Desoxyadenosin, Desoxyguanosin, Desoxycytidin, Desoxythymidin, Inosin, Pyrimidin, Cytosin, Uracil, Thymin, Purin, Adenin, Guanin, Methylcytosin, 5-Hydroxymethyl-cytosin, 2-Methyladenin, 1-Methylguanin, Thiamin, Flavin, Riboflavin sowie Pyridoxalphosphat, Pyridoxaminphosphat, Ribonucleinsäure, Ribonucleinsäuresequenzen, Desoxyribonucleinsäuren, Desoxyribonucleinsäuresequenzen und/oder (iii) Alkyl-, Aryl-, und/oder Alkyl-aryl-polyethylenglykol- phosphaten oder -phosphonaten, wobei die Zahl der Kohlenstoffatome der Alkylgruppe im Bereich von 5 bis 22, und die Zahl der Ethylenglykolgruppen im Polyethylenglykol im Bereich zwischen 4 und 1000 liegt,

(iv) stickstoffhaltigen Polysacchariden, aufgewählt unter Mucopolysacchariden, Glykoproteiden, Chitinen, sowie deren Denaturierungsprodukten.

10. Verfahren zur Herstellung von stabilisierten superparamagnetischen Teilchen unter Herstellung von superparamagnetischen Eindomänenteilchen aus Eisenoxid-, Eisenmischoxid- oder Eisen mit einer Teilchengröße im Bereich zwischen 3 und 20 Nanometer durch Fällung aus wäßrigen Eisensalzlösungen mit Alkalilauge oder Ammoniakwasser, wobei die Dispersion aus superparamagnetischen Eindomänenteilchen mit Salzsäure auf einen pH-Wert zwischen 1 und 7 eingestellt und unter erhöhter Temperatur und gegebenenfalls erhöhtem Druck zur Aggregation gebracht wird zu stabilen, abbaubaren superparamagnetischen Aggregaten mit einem Teilchengröße im Bereich zwischen 10 und 1000 Nanometer mit definiertem Verhalten im Magnetfeld, und diese gereinigt werden, dadurch gekennzeichnet, daß die superparamagnetischen Aggregate mit 20 bis 50 Gew.-% organischer Substanz behandelt werden, so daß sie auf ihrer Oberfläche mono- und/oder polyhydroxylgruppenhaltige aromatische Substanzen, polyhydroxylgruppenhaltigen Substanzen, ausgewählt unter Polyglycerinen und deren Derivaten, aminosäurenhaltige Substanzen, silikatgruppenhaltige Substanzen der Orthokieselsäure und deren Kondensationsprodukte mit zwei und mehrwertigen anorganischen Ionen und/oder organischen Säuren und Basen, sowie phosphatgruppenhaltige Substanzen der Ortho- oder Metaphosphorsäure und deren Kondensationsprodukte und gegebenenfalls organische Substanzen der Gruppe der phosphat-, diphosphat-, carboxylat-, polyphosphat-, thiophosphat-, phosphonat-, thiophosphonat-, sulfat-, sulfonat-, mercapto-, carboxylat-, silantriol-, trialkoxysilangruppenhaltigen Polyalkylenglykole, Polyglycerine oder Kohlehydrate, der Gruppe der phosphatgruppenhaltigen Nucleotide, deren Oligomere oder Polymere, der Gruppe der Alkyl-, Aryl-, und/oder Alkyl-aryl-polyethylenglykol-phosphate oder -phosphonate, der Gruppe der Mucopolysaccharide, Glykoproteide, Chitine, sowie deren Derivate und Denaturierungsprodukte, gebunden tragen, die weitere Bindungsstellen haben können und in an sich bekannter Weise gereinigt und gegebenenfalls noch mit pharmakologisch oder diagnostisch wirksamen Substanzen in an sich bekannter Weise gekoppelt werden.

11. Pharmakologisch wirksame Zubereitung, bestehend aus einem pharmakologisch annehmbaren Träger und superparamagnetischen Teilchen nach Anspruch 1 mit einer Teilchengröße im Bereich zwischen 10 und 1000 nm, gegebenenfalls in Verbindung mit einer gewebespezifischen Bindungssubstanz, einer pharmakologisch wirksamen Substanz, einer pharmakologisch wirksamen Zelle, einem pharmakolo-

gisch wirksamen Komplexbildner, einer zellfusionvermittelnden Substanz und/oder einer gentransfer-vermittelnden Substanz.

12. Verwendung einer pharmakologisch wirksamen Zubereitung nach Anspruch 11 zur Tumorschädigung, zur Immunsteigerung, zum magnetischen drug targeting, zur Zellfusion, zum Gentransfer, als Kontrastmittel, sowie als magnetischen Ionenaustauscher und magnetische Adsorbentien für Separationsverfahren, gegebenfalls unter Einwirkung von Magnetfeldern.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern:  Application No  
PCT/DE 95/01028

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 6	G01N33/543	G01N33/553	C12Q1/68	C12N11/00	A61K9/50
B03C1/00					

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,93 26019 (MOLECULAR BIOQUEST, INC.) 23 December 1993 see abstract; claims ---	1-12
X	WO,A,94 09368 (COULTER CORPORATION) 28 April 1994 see abstract; claims ---	1-12
X	WO,A,94 11103 (J. F. WILLIAMS) 26 May 1994 see the whole document ---	1-12
X	EP,A,0 176 638 (FUJIREBIO KABUSHIKI KAISHA) 9 April 1986 see the whole document ---	1-12
X	EP,A,0 156 537 (THE BOARD OF REGENTS THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 2 October 1985 see the whole document ---	1-12
	-/---	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- 'A' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 November 1995

Date of mailing of the international search report

24.11.95

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentiaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo rd.  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Griffith, G

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern'l Application No  
PCT/DE 95/01028

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 184 710 (BAYER AG) 18 June 1986 see the whole document ---	1-12
X	EP,A,0 321 322 (RHONE-POULENC CHIMIE) 21 June 1989 see the whole document ---	1-12
X	EP,A,0 332 022 (BEHRINGWERKE AG) 13 September 1989 see the whole document -----	1-12

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

Internal Application No	Application No
PCT/DE 95/01028	

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO-A-9326019	23-12-93	US-A-	5441746	15-08-95
		US-A-	5389377	14-02-95
		CA-A-	2137145	23-12-93
		EP-A-	0645048	29-03-95
-----				
WO-A-9409368	28-04-94	AU-B-	5360394	09-05-94
		CA-A-	2146964	28-04-94
		EP-A-	0665955	09-08-95
-----				
WO-A-9411103	26-05-94	AU-B-	5427394	08-06-94
		EP-A-	0621802	02-11-94
-----				
EP-A-0176638	09-04-86	NONE		
-----				
EP-A-0156537	02-10-85	JP-A-	61087303	02-05-86
		US-A-	4920061	24-04-90
-----				
EP-A-184710	18-06-86	DE-A-	3444939	12-06-86
		JP-A-	61140523	27-06-86
-----				
EP-A-321322	21-06-89	FR-A-	2624873	23-06-89
		AU-B-	2693888	22-06-89
		DE-A-	3866341	02-01-92
		JP-A-	1259064	16-10-89
		JP-B-	7062109	05-07-95
		US-A-	4985166	15-01-91
		US-A-	5108636	28-04-92
-----				
EP-A-332022	13-09-89	DE-A-	3807904	21-09-89
		AT-T-	114667	15-12-94
		AU-B-	3113589	14-09-89
		DE-D-	58908667	12-01-95
		ES-T-	2064373	01-02-95
		JP-A-	2152997	12-06-90
		PT-B-	89963	31-05-94
-----				

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat.	Int. Aktenzeichen
PCT/DE 95/01028	

<b>A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 6 G01N33/543 G01N33/553 C12Q1/68 C12N11/00 A61K9/50 B03C1/00		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b> Recherchierte Mindestpräzisierung (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole) IPK 6 G01N A61K		
Recherchierte aber nicht zum Mindestpräzisierung gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,93 26019 (MOLECULAR BIOQUEST, INC.) 23.Dezember 1993 siehe Zusammenfassung; Ansprüche ---	1-12
X	WO,A,94 09368 (COULTER CORPORATION) 28.April 1994 siehe Zusammenfassung; Ansprüche ---	1-12
X	WO,A,94 11103 (J. F. WILLIAMS) 26.Mai 1994 siehe das ganze Dokument ---	1-12
X	EP,A,0 176 638 (FUJIIREBIO KABUSHIKI KAISHA) 9.April 1986 siehe das ganze Dokument ---	1-12
X	EP,A,0 156 537 (THE BOARD OF REGENTS THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 2.Oktober 1985 siehe das ganze Dokument ---	1-12
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie	
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : 'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist 'E' Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist 'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Rechercheschein genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie aufgeführt) 'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht 'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		
*'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis der Erfindung zugrundeliegenden Prinzipiell oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *'A' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Anmeldedatum des internationalen Recherchenberichts	
16.November 1995	24.11.95	
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Griffith, G	

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat.	Ies Aktenzeichen
PCT/DE 95/01028	

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP,A,0 184 710 (BAYER AG) 18.Juni 1986 siehe das ganze Dokument ---	1-12
X	EP,A,0 321 322 (RHONE-POULENC CHIMIE) 21.Juni 1989 siehe das ganze Dokument ---	1-12
X	EP,A,0 332 022 (BEHRINGWERKE AG) 13.September 1989 siehe das ganze Dokument -----	1-12

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

 Internat. es Aktenzeichen  
**PCT/DE 95/01028**

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO-A-9326019	23-12-93	US-A-	5441746	15-08-95
		US-A-	5389377	14-02-95
		CA-A-	2137145	23-12-93
		EP-A-	0645048	29-03-95
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9409368	28-04-94	AU-B-	5360394	09-05-94
		CA-A-	2146964	28-04-94
		EP-A-	0665955	09-08-95
-----	-----	-----	-----	-----
WO-A-9411103	26-05-94	AU-B-	5427394	08-06-94
		EP-A-	0621802	02-11-94
-----	-----	-----	-----	-----
EP-A-0176638	09-04-86	KEINE		-----
-----	-----	-----	-----	-----
EP-A-0156537	02-10-85	JP-A-	61087303	02-05-86
		US-A-	4920061	24-04-90
-----	-----	-----	-----	-----
EP-A-184710	18-06-86	DE-A-	3444939	12-06-86
		JP-A-	61140523	27-06-86
-----	-----	-----	-----	-----
EP-A-321322	21-06-89	FR-A-	2624873	23-06-89
		AU-B-	2693888	22-06-89
		DE-A-	3866341	02-01-92
		JP-A-	1259064	16-10-89
		JP-B-	7062109	05-07-95
		US-A-	4985166	15-01-91
		US-A-	5108636	28-04-92
-----	-----	-----	-----	-----
EP-A-332022	13-09-89	DE-A-	3807904	21-09-89
		AT-T-	114667	15-12-94
		AU-B-	3113589	14-09-89
		DE-D-	58908667	12-01-95
		ES-T-	2064373	01-02-95
		JP-A-	2152997	12-06-90
		PT-B-	89963	31-05-94
-----	-----	-----	-----	-----